

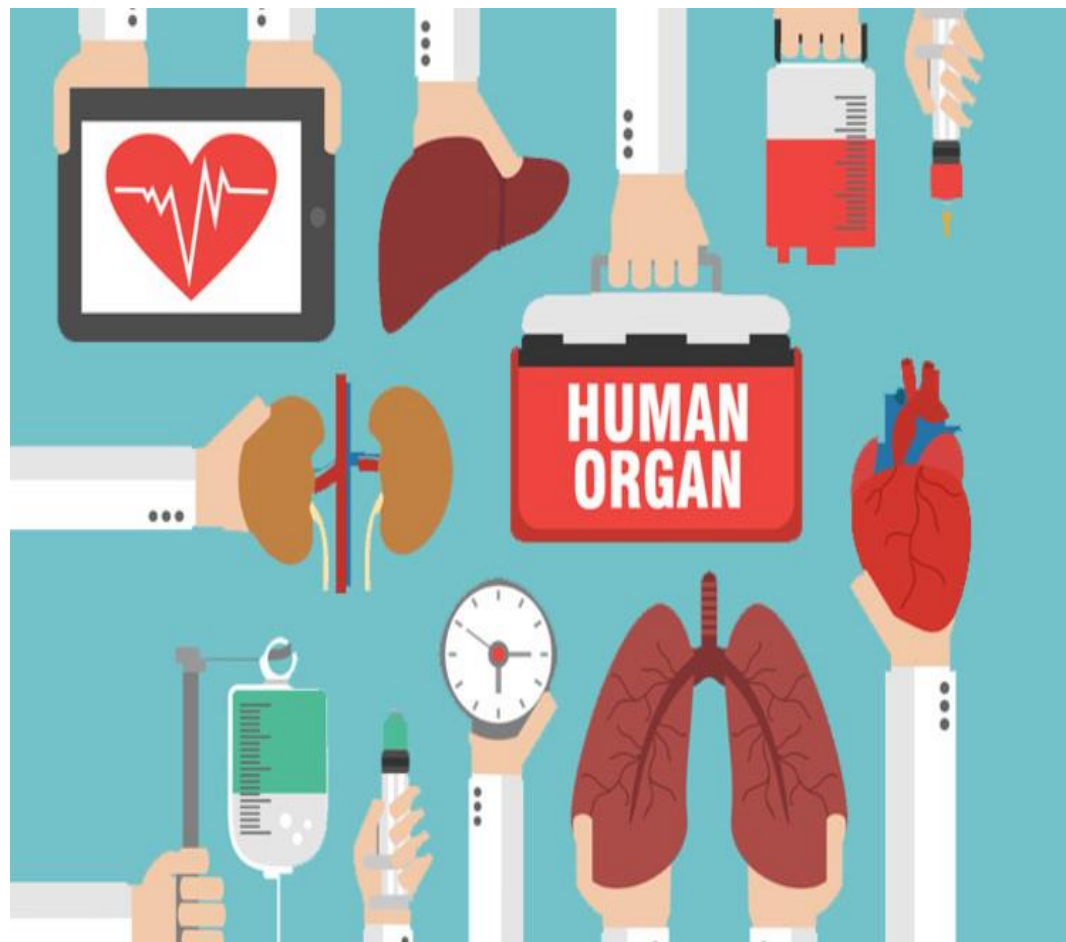
Recherche et Développement en Biotechnologie

**Cours 2 : Culture et Ingénierie des
Cellules et Tissus**

À l'heure actuelle, la dégénérescence de tissus et la défaillance d'organes représentent la moitié des coûts de santé dans le monde.

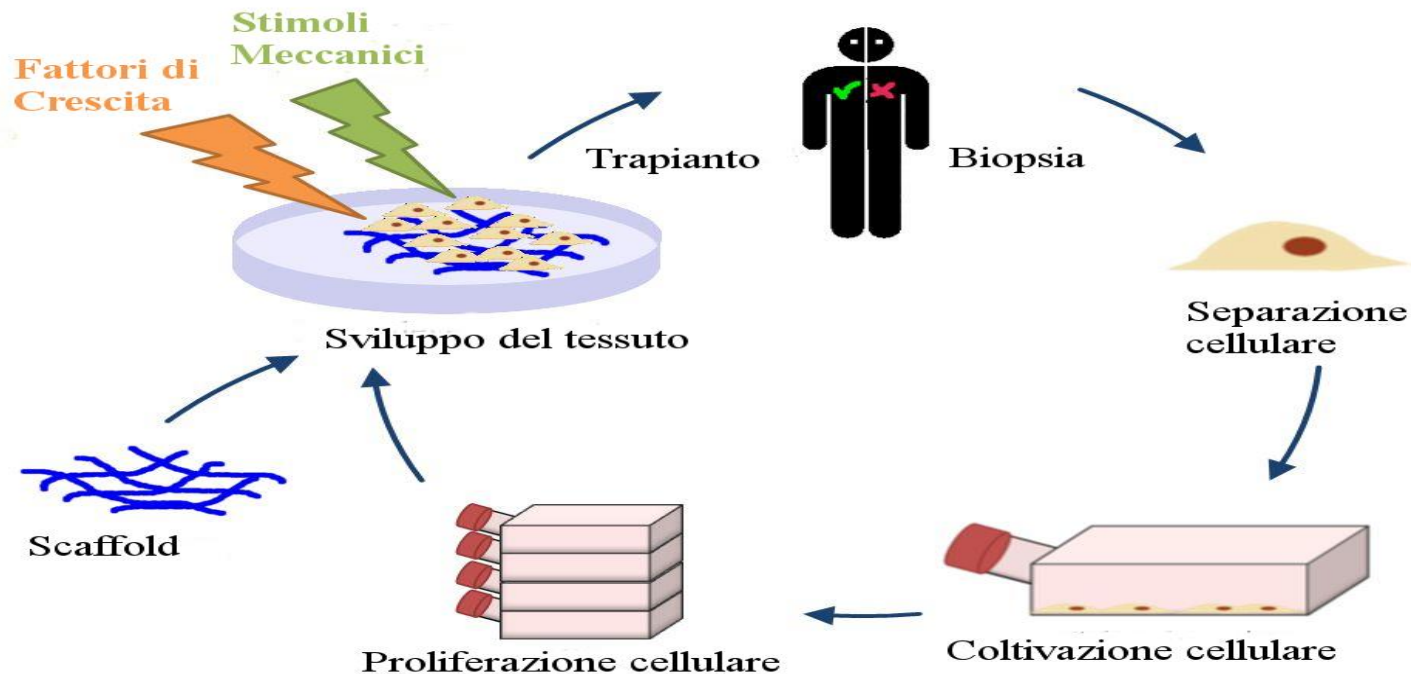


Bien que les greffes soient communément employées comme solution aux défaillances d'organes, de nombreux patients en attente d'une greffe ne la recevront pas à temps. Il n'y a pas, jusqu'ici, de solution à long terme à ce problème.



Le génie tissulaire émerge comme solution potentielle et (ou) comme solution de rechange à d'autres thérapies, suscite l'intérêt de plusieurs sources universitaires et industrielles.

Le génie tissulaire vise à aider le corps à régénérer des fonctions plutôt que de masquer les symptômes comme c'est le cas de nombreuses thérapies aujourd'hui

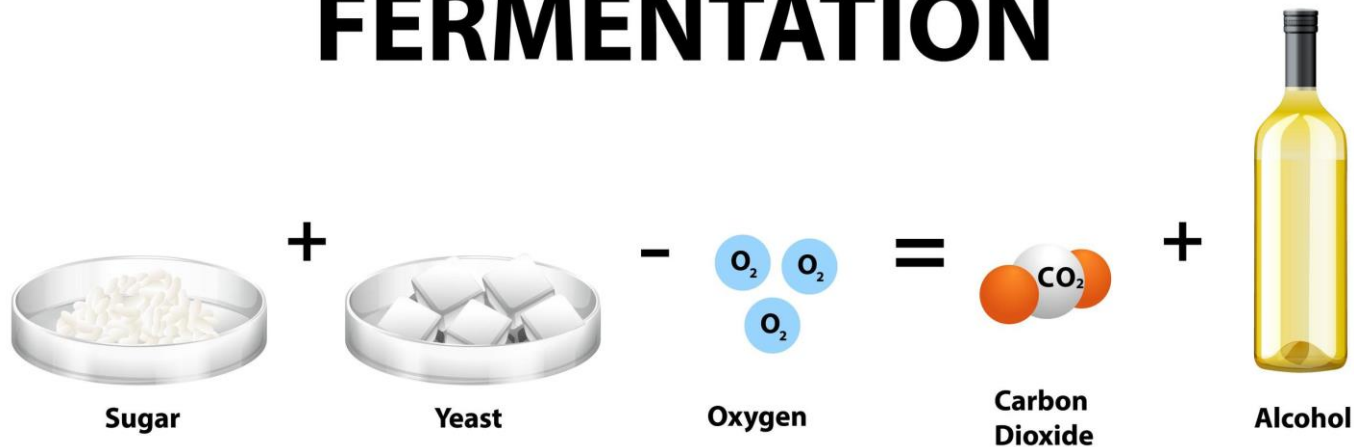


Principes de base et Concepts

1. La fermentation

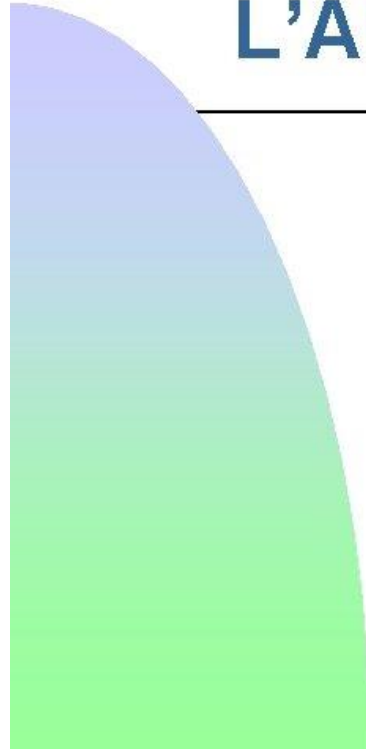
La fermentation est un phénomène naturel, se produisant lors de la décomposition de la matière organique par les microorganismes, substrats glucidiques notamment, sans utilisation d'oxygène. Au cours de cette dégradation il y a production d'acide, d'alcool ou de gaz. Ce sont des molécules d'intérêts, qui présentent un bénéfice pour l'Homme.

FERMENTATION



2. L'ADN recombinant

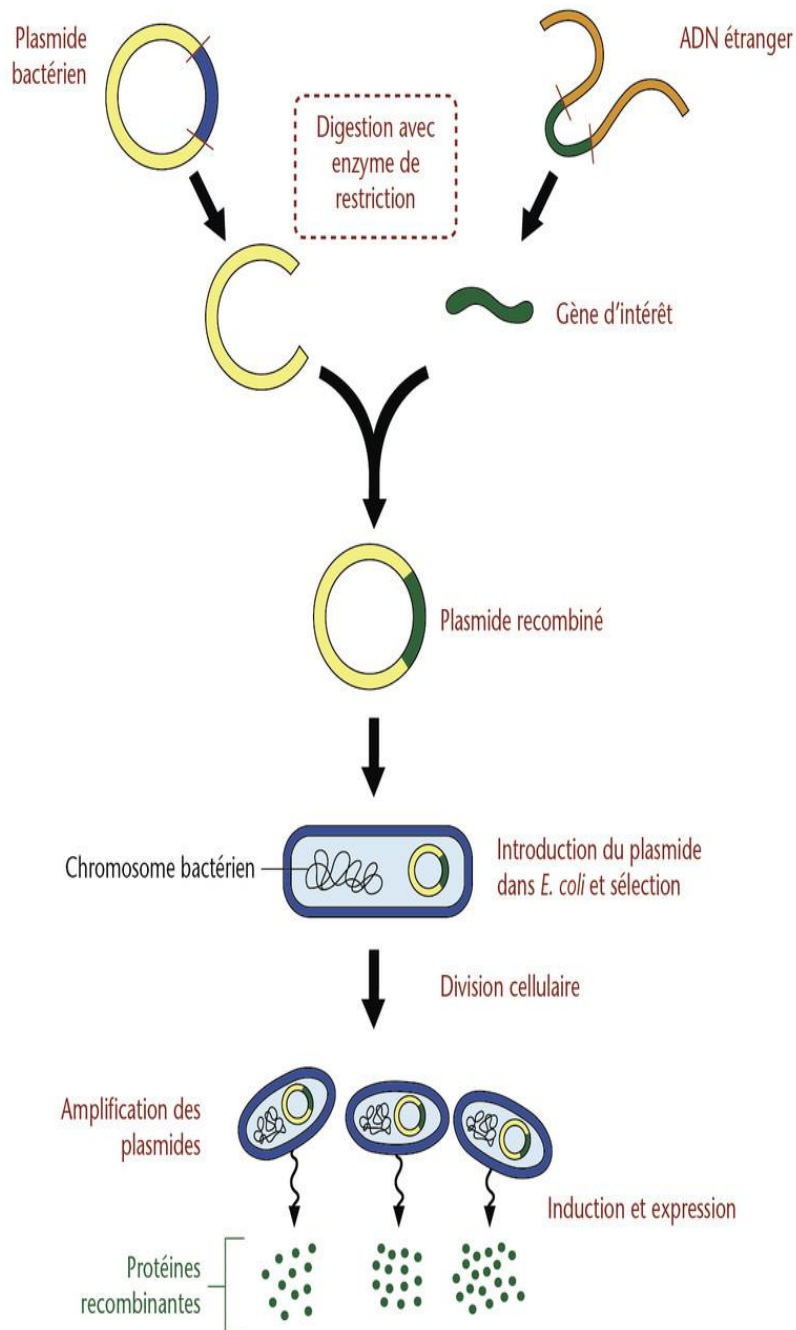
La technique d'ADN recombinant est basée sur l'utilisation d'outils biologiques agissant comme un ciseau appelés «enzymes de restriction» qui permettent de «découper» des gènes issus de l'ADN humain.



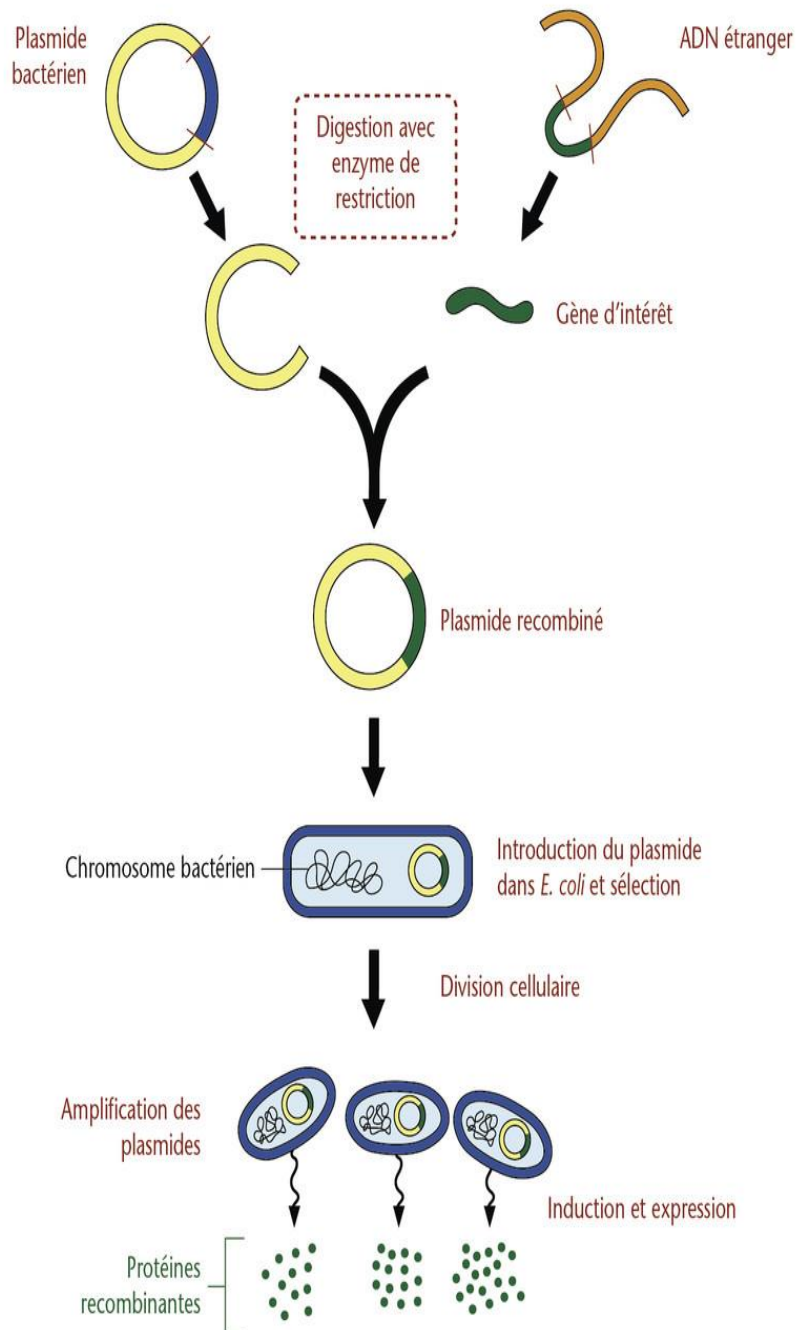
TECHNOLOGIE DE L'ADN RECOMBINANT



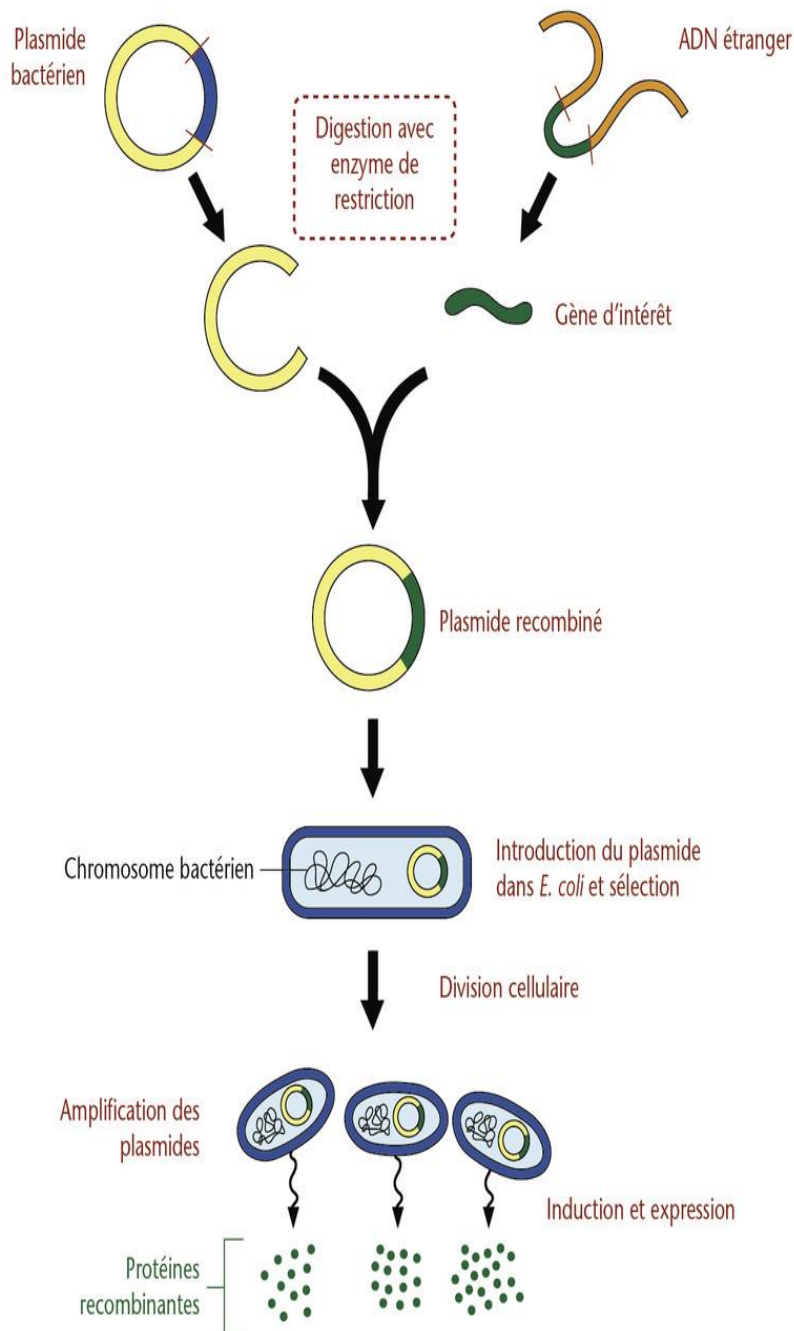
Des lors, l'idée de couper une molécule d'ADN puis insérer un fragment issu d'une autre molécule était envisageable.



Ainsi des fragments d'ADN d'intérêt pouvaient être coupés d'un organisme donneur par les enzymes de restrictions puis inséré directement dans l'ADN d'un organisme hôte afin de faire exprimer de nouveaux caractères inexistants chez l'hôte par l'intermédiaire de vecteurs représentés le plus souvent par des plasmides bactériens.



Construit de cette façon, le plasmide recombinant est inséré dans une bactérie, une levure ou dans des cellules d'origine animale puis mis en culture dans un processus dit de transformation.



Dans ce dernier cas, les vecteurs ADN recombinant se multiplient au rythme des divisions bactériennes et on obtient des milliers de vecteur recombinant porteur du fragment d'ADN inséré.

On dit alors que le vecteur recombinant est cloné.

3. La culture de tissus végétaux

La culture de tissus végétaux est possible par une technique appelée, la culture *in vitro* ou micropropagation ou microbouturage.

C'est une technique qui permet la régénération d'une plante entière à partir de cellules ou de fragments de tissus végétaux mis dans un milieu nutritif approprié (stérile et contrôlé).



La plante obtenue ressemble parfaitement, sur le plan morphologique et génétique, à la plante dont on a prélevé cellules ou fragment de tissu. On parle alors d'un clone.



Les objectifs de ce type de clonage sont :

D'une part de produire en quantité et dans des délais courts, des plantes d'intérêt agronomique, forestière ou horticole issues des cycles de sélection et amélioration.

D'autre part la reproduction de plantes qui présentent des difficultés ou des obstacles à la reproduction naturelle.

Les techniques de la culture *in vitro* des tissus végétaux sont utilisés en Algérie pour la multiplication de cultivars de palmier dattier résistants au bayoud, une maladie d'origine fongique qui détruit les palmeraies Algériennes et Marocaines.

Un des premiers symptômes externes typiques d'une attaque de Bayoud est un dessèchement et un blanchiment unilatéral d'une ou plusieurs palmes



4. La culture de cellules animales

On appelle culture cellulaire, le maintien en dehors de l'organisme, des cellules non organisées en tissu mais capable de se diviser *in vitro* et d'exprimer des métabolismes et des fonctions spécifiques.

Les procédés de culture en masse de cellules animales sont devenus essentiels aux industries des biotechnologies pour l'obtention de nombreux produits à application thérapeutique et diagnostique (vaccins viraux, cytokines, facteurs de croissance, anticorps monoclonaux, protéines recombinantes, etc.)

Culture de tissus animale est le terme général englobant le prélèvement de cellules, tissus ou organes d'un animal et leur placement ultérieur dans un environnement artificiel conduisant à leur croissance. Cet environnement est généralement constitué de récipients de cultures appropriés en verre ou en plastique contenant un milieu liquide ou semisolide qui apporte les nutriments essentiels à la survie et à la croissance.



Culture primaire

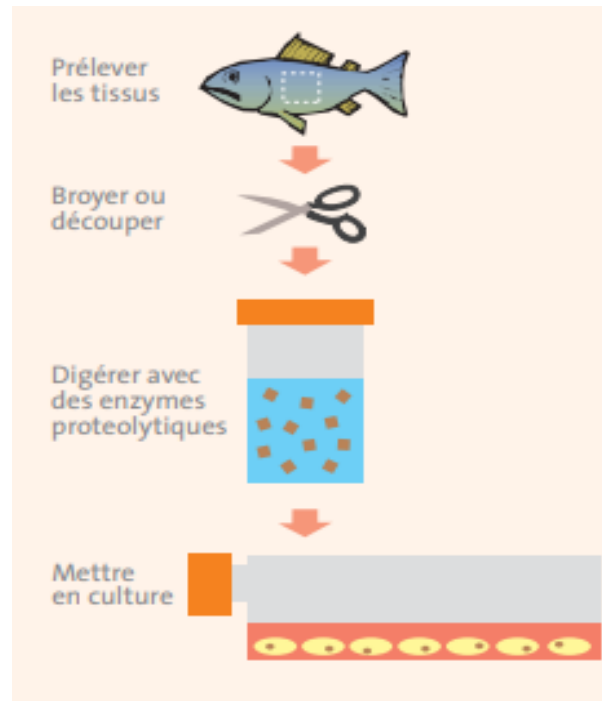
Lorsque les cellules sont prélevées chirurgicalement d'un organisme et placées dans un environnement de culture approprié, elles se fixent, se divisent et prolifèrent. C'est ce qu'on appelle une Culture primaire.

Il existe deux méthodes de base pour faire cela.

Dans la première, pour les Cultures d'explants, de petits morceaux de tissus sont fixés sur un récipient de culture en verre ou en plastique traité et baignés dans du milieu de culture. Après quelques jours, des cellules individuelles se déplacent de l'explant de tissus vers la surface du récipient de culture ou le substrat où elles commencent à se diviser et proliférer.

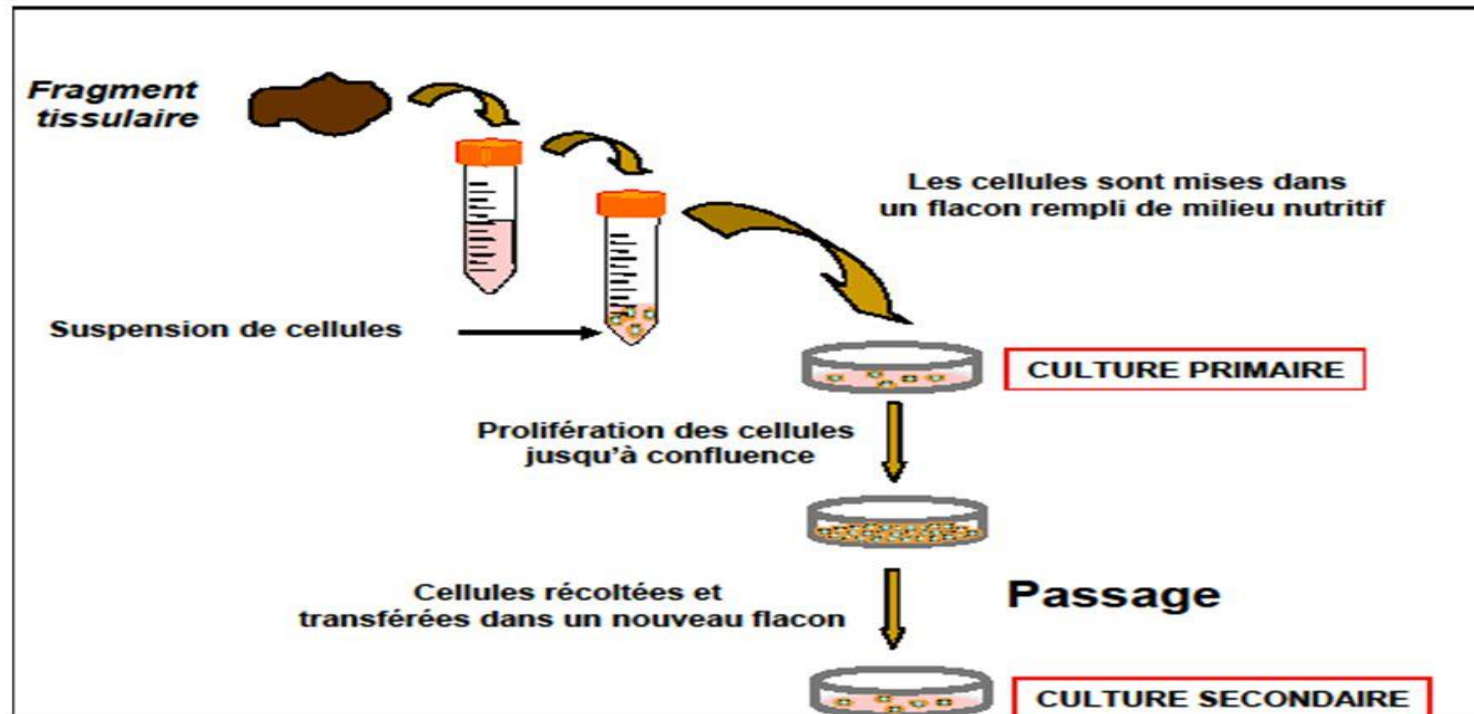
Dans la deuxième, méthode la plus généralement utilisée, ce processus est accéléré en ajoutant des enzymes de digestion (protéolytiques), telles que la trypsine ou la collagénase, à des fragments de tissus pour dissoudre le ciment maintenant les cellules ensemble. Ceci crée une suspension de cellules individuelles qui sont placées dans des récipients de culture contenant un milieu de culture pour les laisser pousser et se diviser. Cette méthode est appelée

Dissociation enzymatique



Repiquage

Lorsque les cellules dans le récipient de culture primaire ont poussé et couvert tout le substrat de culture disponible, elles doivent être repiquées pour leur donner de la place afin d'avoir une croissance continue. Cela se fait généralement en les retirant aussi délicatement que possible du substrat avec des enzymes



Cellules adultes

Cellules embryonnaires

Animal euthanasié

Biopsie

Embryon de mammifère

Embryon d'oiseau

Acquisition

Isolement du tissu

Dissection grossière

Dissection et désagrégation

Désagrégation enzymatique

Désagrégation mécanique

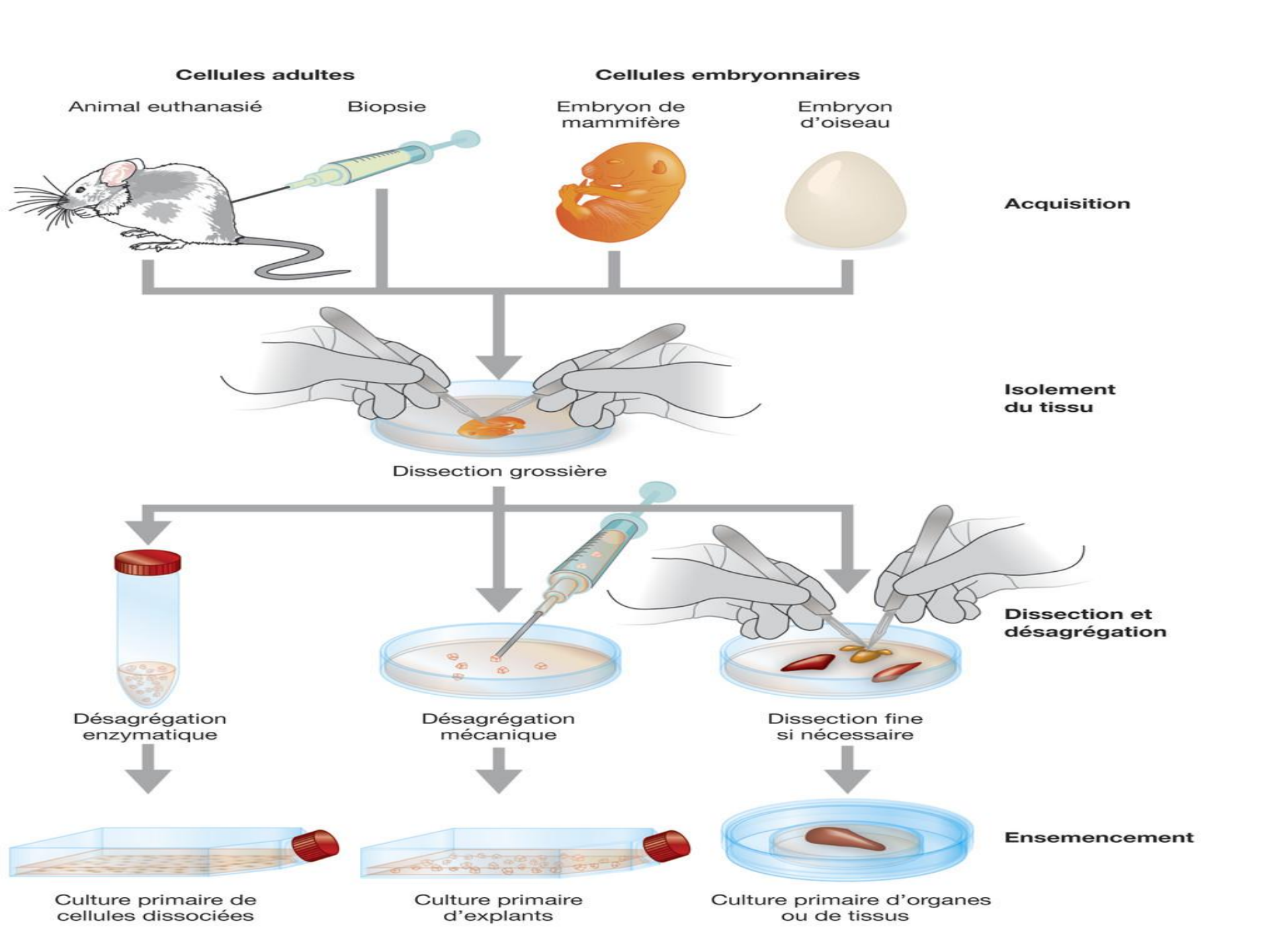
Dissection fine si nécessaire

Ensemencement

Culture primaire de cellules dissociées

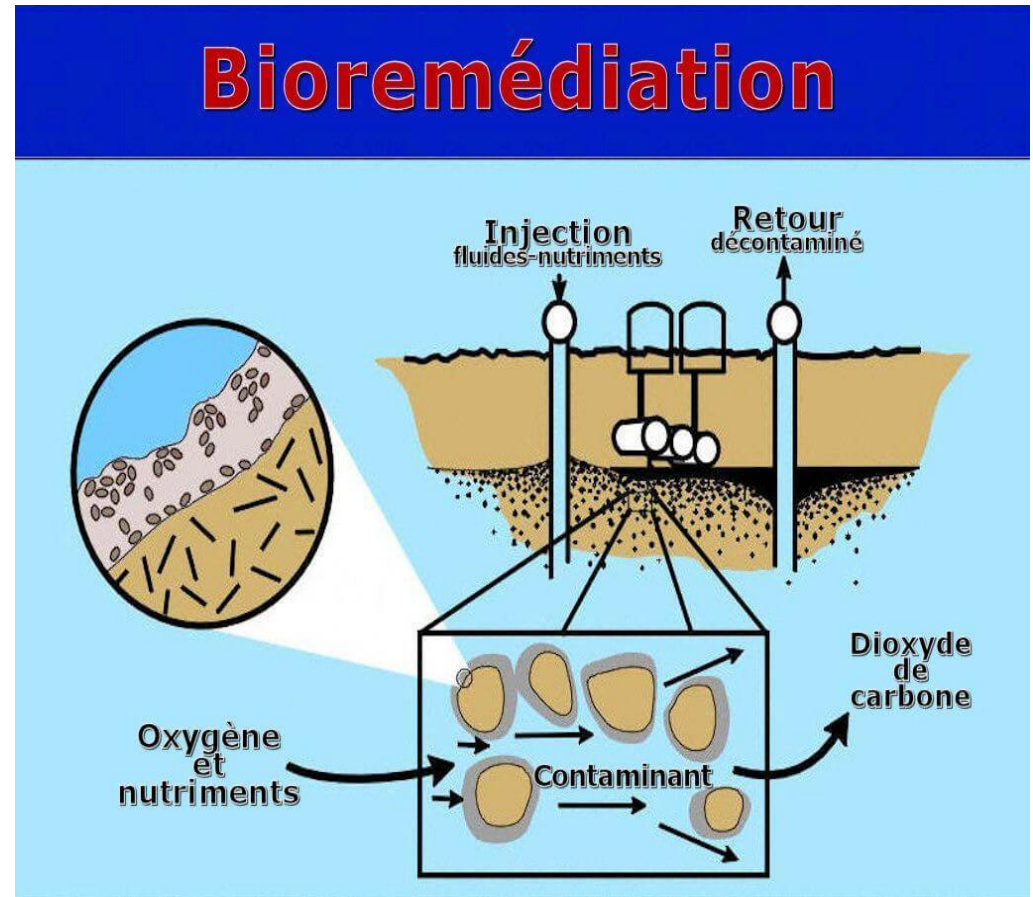
Culture primaire d'explants

Culture primaire d'organes ou de tissus



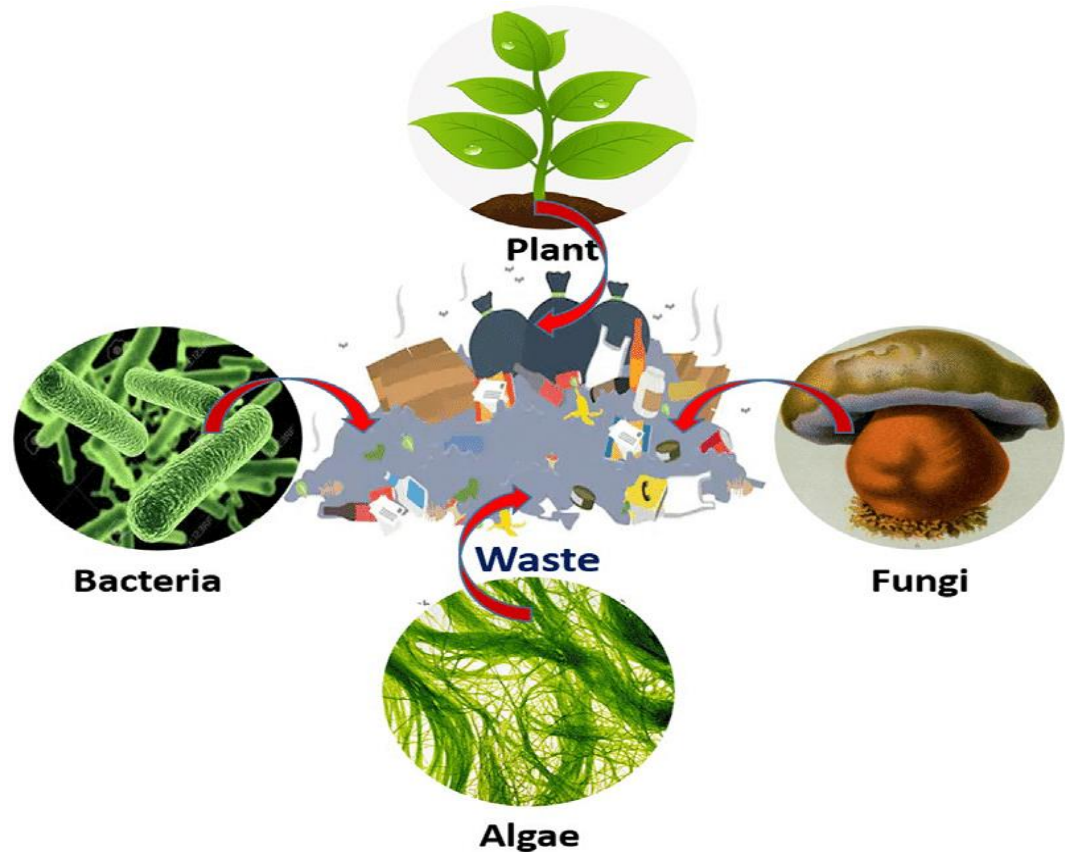
La biorémédiation

C'est une technique de gestion des déchets par l'utilisation d'organismes pour supprimer ou neutraliser les polluants ou contaminants à partir d'un site contaminé.



La manipulation génétique a permis d'obtenir des microorganismes et des enzymes spécifiques de dégradation et de métabolisation des produits résiduels toxiques.

L'utilisation de microorganismes ou d'enzymes constitue une technique moins polluante et des déchets plus biodégradables.



Quelques exemples de techniques de biorémediation :

- Obtention de méthane et de gaz à partir de déchets solides urbains.
- Digestion de déchets végétaux via bactéries, épurateurs biologiques.
- Dégradation des hydrocarbures par les microorganismes

Modifier des gènes dans les cellules vivantes n'est pas une chose facile



Edition génomique

Est une technique de génie génétique reposant sur la modification de génome d'un organisme, elle consiste à l'utilisation de **nucléase artificiel** afin d'introduire des cassures double brin à une position précise du génome.



Edition génomique

Cette coupure permet de modifier la séquence d'ADN à cet endroit par l'inactivation de ce gène ou d'insérer un nouveau ou de remplacer un gène par une autre version, et cela soit par de délétion ou insertion d'une séquence d'intérêt.



Qu'est-ce que le système CRISPR-Cas9 d'ingénierie/édition du génome ?

CRISPR (*clustered regularly interspaced short palindromic repeat*) est venue détrôner toutes les autres approches, et ce pour quatre raisons : **précision, rapidité, fiabilité, faible coût.**

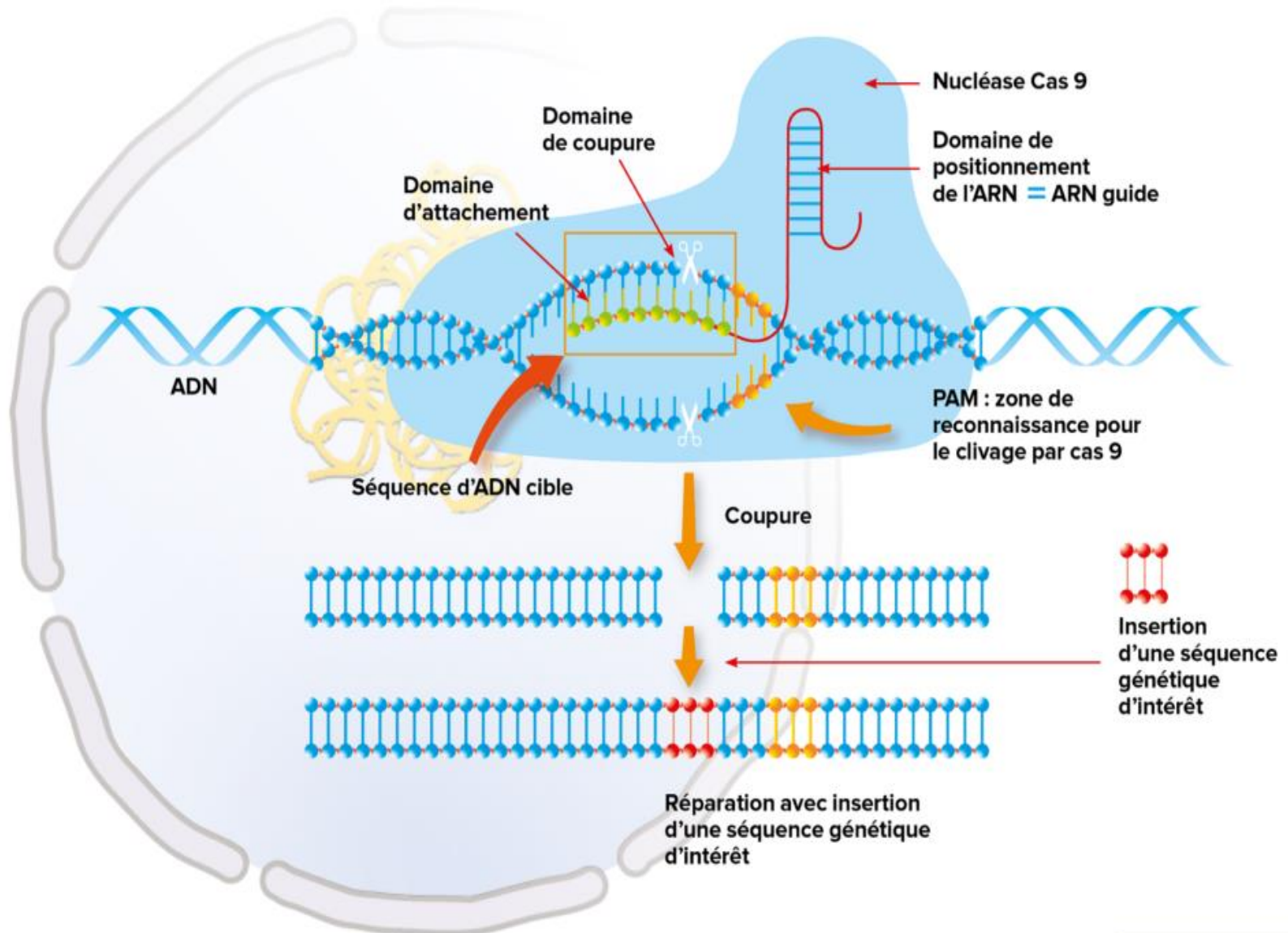


CRISPR-Cas9 est en quelque sorte un ciseau moléculaire capable d'induire une cassure double brin de l'ADN en un site choisi du génome.

Il faut pour ce faire d'une part le ciseau, une enzyme nucléase qui coupe les deux brins d'ADN, ici Cas9, et un guide, qui reconnaît la séquence à couper, ici il s'agit d'un ARN-guide, homologue à la séquence que l'on veut cibler .

En résumé, la nucléase Cas9, guidée par son ARN guide (gARN) se lie au locus génomique de choix qui doit se situer à proximité d'un motif de reconnaissance appelé PAM. Cas9 crée alors une cassure double brin.

Retouche génomique par le système CRISPR - Cas 9



Les systèmes de réparation de l'ADN existants dans toutes les cellules, permettront d'apporter des modifications de l'ADN au site de cassure (insertion, mutation, délétion).

Si l'idée initiale est d'invalider l'expression du gène, il suffit en général de laisser les systèmes de réparation faire. La cassure est mal réparée et le gène « réparé » sera inefficace.

Si l'objectif est de corriger une mutation préexistante, il faudra que la réparation rétablisse une séquence « normale » après la cassure du gène muté, et pour cela, on introduit une séquence-guide et la cellule répare la cassure en copiant la séquence « normale » que l'on aura introduite.

Application de l'édition génomique :

Permet l'étude de gène en l'inactivant spécifiquement par l'induction des mutations ou bien de crée de nouvelle ligne cellulaire exprimant un transgène choisi.

La création de nouveau modèles animaux notamment pour étudiée des maladies génétiques humaines.

La correction de la mutation dans les cellules de patient afin de combattre et guérir une maladie génétique

L'édition génomique fera partie également de future thérapie par la possibilité de modifier les cellules extraite de patient pour corriger les mutations responsable de la maladie mais avant pouvoir de réinjecter ces cellules aux patient il faut en effet vérifier la faisabilité chez l'animal et entrer en essai clinique chez l'Homme

A. La thérapie cellulaire

Consiste à utiliser des cellules corporelles pour cultiver un nouveau tissu fonctionnel voir identique au tissu natif que ce soit *in vitro* ou *in vivo*.

S'appuie sur l'emploi de cellules mises en culture sous différentes contraintes physico-biochimiques *in vitro* ou *in vivo*, afin de régénérer ou même synthétiser un tissu ou un organe. Son principe en est assez simple :



B. La thérapie transgénique

Cette thérapie utilise des cellules génétiquement modifiées (cellules transgéniques)

La thérapie génique a été initialement conçue comme une approche thérapeutique destinées aux maladies monogéniques (liée à la dysfonction d'un seul gène), délivrant aux cellules un gène « sain » capable de suppléer le gène « malade ». Aujourd'hui, les modalités et les indications se révèlent beaucoup plus larges, avec 65% des essais cliniques qui concernent le traitement de cancers.

Cette première stratégie consiste à **importer la copie d'un gène fonctionnel dans une cellule cible, pour qu'elle s'y exprime et aboutisse à la production de la protéine qui fait défaut.**

Selon les indications, ce travail peut être effectué :

in vivo directement dans l'organisme le patient

ex vivo, afin de modifier génétiquement les cellules en laboratoire avant de les réinjecter au malade

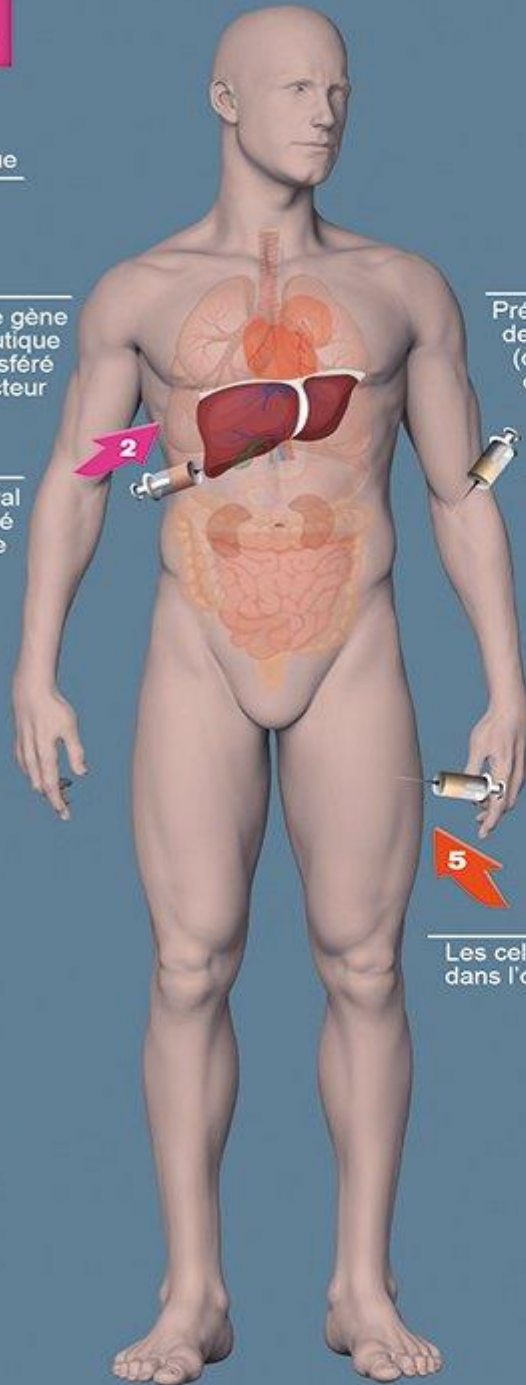
Modification des cellules *IN VIVO*

Modification des cellules *EX VIVO*



Le gène thérapeutique est transféré dans un vecteur

Le vecteur viral est directement injecté dans l'organe cible



Prélèvement de cellules souches (dans le sang ou la moelle osseuse)



Vecteur viral



Le vecteur viral pénètre dans les cellules prélevées chez le patient



Les cellules se multiplient et expriment le gène thérapeutique

Les cellules sont réinjectées dans l'organisme du patient

Travailler *ex vivo* permet de mieux contrôler les étapes, d'utiliser moins de vecteurs et d'éviter la dispersion du traitement dans des organes non ciblés. Cette solution est la plus souvent utilisée pour le traitement des maladies sanguines, car il est possible de prélever les cellules à corriger par une simple prise de sang.

Pour d'autres maladies, telles que des maladies musculaires, respiratoires, oculaires, cardiaques ou encore neurologiques, le transfert du gène se fait *in vivo*, par injection du gène vectorisé directement dans l'organisme ou dans l'organe à traiter, comme un médicament.

Les débuts de la thérapie génique ont été marqués par quelques accidents liés à l'utilisation de vecteurs viraux. Ceux-ci ont entraîné des réactions inflammatoires incontrôlables ou provoqué des cancers liés à l'intégration du gène thérapeutique à proximité d'oncogènes.

Bien que rares, ces accidents ont incité les chercheurs à mieux comprendre le fonctionnement de ces vecteurs viraux et la façon dont ils intègrent leur ADN dans les chromosomes de l'hôte. Surtout, de nouvelles générations de vecteurs sécurisés ont été mises au point.